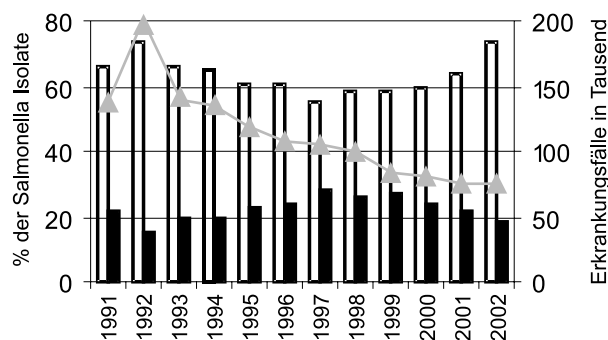


Anwendung von TAD Salmonella vac® T und TAD Salmonella vac® E in der Geflügelpraxis unter besonderer Berücksichtigung der Impfstoffapplikation und -kontrolle

Dr. Ilka Schröder, Dr. Michael Iburg und Dr. Dr. Dierk E. Rebeski (Cuxhaven)

Obwohl die Salmonella-Befundhäufigkeit beim Menschen in Deutschland stetig rückläufig ist und bei 63.061 registrierten Fällen im Jahr 2003 lag, ist *S. Enteritidis* (S.E.) die am häufigsten nachgewiesene Serovar. Der prozentuale Anteil ist sogar gewachsen und betrug im Jahr 2002 71 % (HARTUNG, 2002).

Abbildung 1: Vorkommen von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* (dunkle Balken) beim Menschen



Nach wie vor werden menschliche Infektionen mit dem Verzehr von unsachgemäß zubereiteten, zu lange und mangelhaft gelagerten Roheispeisen in Verbindung gebracht.

Bei Planproben für Konsumeier stieg im Jahr 2002 die Befallsrate mit Salmonellen auf 0,62 % gegenüber 0,36 % im Jahr 1999 (FEHLHABER, 2001; HARTUNG, 2002). Dabei betrug der Anteil von S.E. 84,2 %.

Bei der anscheinend geringen Kontaminationsrate der Eier als mögliche Ursache von Salmonella-Erkrankungen des Menschen ist zu bedenken, dass in der Bundesrepublik Deutschland 17 Milliarden Eier pro Jahr verzehrt werden. Ein Anteil von 0,62 % von 17 Milliarden ergibt 105 Millionen mit Salmonella kontaminierte Eier, die sich pro Jahr auf dem Markt befinden. Bei 80 Millionen Einwohnern entfällt statistisch mindestens ein kontaminiertes Ei pro Kopf und Jahr (GURTLER, 2002).

METHNER (2003) untersuchte im Rahmen einer Feldstudie 677 Sammelkotproben von Legehennen, die aus 341 Herden stammten. In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Anteil der Herden, die mindestens zu einem Untersuchungszeitpunkt einen positiven Salmonella-Befund auswiesen mit 36 % sehr hoch war. Dabei dominierte mit 80 % S.E. (PT 4).

Seit 1994 sind die Tierhalter verpflichtet, alle Junghennen in Aufzuchtbetrieben mit mehr als 250 Tieren gegen Salmonellen zu impfen (Hühner-Salmonellen-VO vom 11. April 1994, BGBl. I. S. 770).

Für die Salmonellen-Impfung stehen dem Anwender *S. Typhimurium*- (*S.Tm.*) und *S.E.*-Lebend- sowie Inaktivat-Impfstoffe zur Verfügung. Die überlegene Wirksamkeit von Lebendimpfstoffen gegen Salmonella-Infektionen wird in zahlreichen Publikationen (GERMANIER und FURER, 1975; CURTISS und KELLY, 1987; BARROW et al., 1990; BARROW et al., 1991; COOPER, 1994; HASSAN und CURTISS, 1997) hervorgehoben und ist durch eigene Ergebnisse (LINDE, HAHN und VIELITZ, 1996; HAHN, 1999) bestätigt. Dabei übertrifft die homologe Wirksamkeit der Salmonella-Lebendimpfstoffe den heterologen Schutz (METHNER, 1991; MARTIN et al., 1996). Es empfiehlt sich somit mit *S.E.* Lebendimpfstoffen zu impfen, wenn diese Serovar im Legehennenbereich nachgewiesen worden ist, statt sich auf die beschriebene Kreuzimmunität mit *S.Tm.* zu verlassen. Bei einem Nachweis von *S.Tm.* muss ebenfalls mit einem homologen Impfstamm geimpft werden, da eine Kreuzimmunität mit *S.E.* nicht besteht. So empfiehlt die größte Lebensmittel-Handelskette TESCO in Grossbritannien den Legehennenhaltern, die Standard-Impfung mit Lebendimpfstoff gegen *S.E.* mit *S.Tm.* zu komplettieren. Dennoch bleibt die Frage, warum bei Anwendung hoch effektiver Impfstoffe immer noch Salmonellen-positive Herden und Eier gefunden werden.

Tabelle 1: Salmonella-Nachweisrate im Ei untersuchter Planproben (nach FEHLHABER, 2001)

	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Eier (%)	0,5	0,4	1,5	1,2	0,4	0,36	0,57	0,53	0,62

METHNER (2003) diskutiert in diesem Zusammenhang die Frage möglicher „technischer“ Probleme bei der oralen Immunisierung, die eine Wirksamkeit der applizierten Salmonella-Lebendimpfstoffe beeinträchtigen. Denn die Durchführung einer erfolgreichen Salmonellen-Impfung mit einem Lebendimpfstoff setzt voraus, dass folgende Kriterien berücksichtigt und erfüllt werden wie von IBURG (2003) ausführlich beschrieben:

- Impfstoffqualität und Handhabung
- Wasserqualität
- Impfstoffapplikation
- Diagnostische Methoden

Impfstoffqualität und Handhabung

Die Verabreichung von Salmonella Lebendimpfstoffen mit dem Trinkwasser kombiniert die Vorteile der einfachen und schnellen Verabreichung des Impfstoffes an eine große Anzahl von Tieren mit den Vorteilen einer hohen Tiergerechtigkeit und Kosteneffizienz. Für Salmonellen wird die Trinkwasserimpfung bevorzugt, da sie den natürlichen Weg der Infektion nachahmt und so einen schnellen und belastbaren Schutz gegen *S.E.* und *S.Tm.* hervorruft.

Berechnen der benötigten Impfstoffmenge

Die Impfstoffetiketten informieren über die zu verabreichende Dosis. Es gilt: 1 Dosis pro Tier, unabhängig von Alter oder Produktionsrichtung des Tieres. Die Impfstoffmengen müssen eingehalten werden, um einen Impfschutz laut Herstellerangabe zu gewährleisten! Es sind immer 1.000 Dosen für 1.000 Tiere einzusetzen. Dabei sollte im Zweifelsfall aufgerundet werden (so sollten zum Beispiel 2.750 Tiere mit 3.000 Impfdosen geimpft werden, wenn die kleinste Handelsform 1.000 Dosen enthält). Des Weiteren sollte immer die benötigte Menge pro Haus angesetzt werden. Somit werden z. B. bei drei Häusern mit jeweils 6.000 Tieren drei Ansätze mit jeweils 6.000 Dosen Impfstoff zubereitet. Die gute Impfpraxis unterlässt den Ansatz mit 18.000 Dosen, der dann auf die drei Häuser verteilt wird!

Ansetzen des Impfstoffes

Die Etiketten weisen auch auf die Haltbarkeitsdauer hin, die nur bei Beibehaltung des Vakuums in der Flasche, der vorschriftsmässigen Lagerung bei 2° bis 8 °C und dem Schutz vor Sonnenlicht gewährleistet ist. Sobald die Flaschen aus der Kühlung entnommen und geöffnet werden, beginnt die Lebendkeimzahl abzufallen. Für die Trinkwasserapplikation bedeutet dieses, dass der Impfstoff nach dem Ansetzen zügig im Tränkewasser verteilt werden muss. Der Zusatz von entrahmter Milch oder Magermilchpulver im Trinkwasser (2 l entrahmte Milch bzw. 2 g Magermilchpulver pro 1.000 l Trinkwasser) verbessert die Stabilität von Impfstoffen im Trinkwasser. Der Impfstoff muss nach zwei Stunden durch das Tier aufgenommen sein. Die Einhaltung hygienischer Vorkehrungen und der mögliche negative Einfluss von Desinfektionsmittelresten auf die Wasserqualität und den Impfstoff sind zu beachten.

Wasserqualität

Es empfiehlt sich, Wasser von Trinkwasserqualität gemäß der Trinkwasser-Verordnung vom 21.05.2001 zu verwenden. Allerdings ist auf den Nitrat- und Nitrit-Gehalt zu achten, der bereits in der maximal zulässigen Trinkwasserkonzentration die Wirksamkeit von Lebendimpfstoffen beeinträchtigt (BEHR et al., 2003). Eine Anreicherung von Eisen oder Chlor vermindert die Überlebensrate des Impfstammes im Trinkwasser (IBURG, 2003).

Da die Stabilität des Impfstoffes unter anderem abhängig ist von der Trinkwassertemperatur (mit höheren Temperaturen verkürzt sich die Haltbarkeit der Impfstofflösung), kann es gerade in den Sommermonaten notwendig sein, die fertig angesetzte Impfstofflösung zu kühlen.

Impfstoffapplikation

Bei Eintagsküken werden überwiegend Stülptränken und bei älteren Tieren Nippeltränken verwendet. Bei der Trinkwasserimpfung mittels Stülptränken ist darauf zu achten, dass alle Tiere in den zwei bis drei Stunden der Impfung zum Wasser gelangen können. Die angebotene Wassermenge beträgt in der Regel zwischen 2 ml und 4 ml pro Küken und ist somit ausreichend für zwei bis drei Stunden Tränkezeit.

Nippeltränke-Systeme eignen sich vor allem zur Impfung von Tieren, die älter als 3 Wochen sind, da erst in diesem Alter eine vorhersagbare Wasseraufnahme gewährleistet ist. Hierbei wird der Impfstoff in konzentrierter Form dem

Trinkwasser entweder über einen Vorratstank oder über einen Dosierautomaten zugeführt, um die Gebrauchsverdünnung zu gewährleisten. Die Verteilung des Wassers im Stall erfolgt über Schlauch- und Rohrleitungen. In diesen befindet sich zu Beginn der Impfung eine teilweise erhebliche Menge an Rest- oder Residualwasser. Dieses Wasser ist vor der Impfung durch „Spülen“ des gesamten Tränkesystems mit impfstoffhaltigem Wasser zu ersetzen. Es ist selbstverständlich, dass das Tränkesystem dem hygienischen Reinheitsstandard entspricht. Maßnahmen zur Bestimmung der Wassermenge werden von IBURG (2003) praxisnah dargestellt.

BEER (1991) sowie COOPER und Mitarbeiter (1994) weisen auf die möglichst frühzeitige Applikation des Lebendimpfstoffes (Erstimpfung) an Eintagsküken. Zum einen wird dadurch eine Besiedlung mit Feldstämmen rechtzeitig verhindert und zum anderen der sich schnell entwickelnden Kolonisationsresistenz der Darmflora gegen Salmonellen vorgebeugt (SUPHABPHANT et al., 1981). Aus diesem Grund sollte die Erstimpfung unmittelbar nach dem Eintreffen der Küken auf der Farm, am ersten Lebenstag erfolgen.

Tabelle 2: Differenzierung von TAD Salmonella vac® T und TAD Salmonella vac® E

Noxe	µg/ml	TAD Salmonella vac® T	TAD Salmonella vac® E	Feldstämmen
Nalidixinsäure	20	resistent	sensitiv	sensitiv
Streptomycin	200	sensitiv	resistent	sensitiv
Rifampicin	200	resistent	resistent	sensitiv
Erythromycin	20	sensitiv	sensitiv	resistent

In folgenden Fällen ist von einer Impfung am ersten Tag abzuraten und die Impfung auf einen späteren Zeitpunkt zu verschieben:

- mit Antibiotika vorbehandelte Tiere dürfen am ersten Lebenstag nicht mit Salmonella-Lebendimpfstoffen geimpft werden. Die Antibiotika-Verabreichung mit der Marek-Impfung verhindert ebenfalls das ausreichende Ansiedeln des Impfstammes am ersten Tag. In diesem Fall ist eine mehrtägige Wartezeit einzuhalten, um die sichere Wirkung des Impfstoffes zu gewährleisten.
- An heißen Tagen oder nach langen Transportwegen kommen Eintagsküken gelegentlich erschöpft im Stall an. Da diese Tiere in den ersten Stunden nach Ankunft im Stall überhaupt nicht trinken, ist entweder eine spätere Impfung oder eine alternative Applikation des Impfstoffes vorzuziehen.
- Erkrankte Tiere oder Tiere, bei denen eine antibiotische Behandlung in den kommenden zwei bis drei Lebenstagen zu erwarten ist, dürfen nicht geimpft werden.

Die Wiederholungsimpfungen in der 6. bis 8. Lebenswoche sowie in der 16. bis 18. Lebenswoche stellen im Vergleich zur Ersttagsimpfung weniger Anforderungen an das Management (IBURG, 2003).

Die Diagnostik

Die Grundlage der Salmonellen-Diagnostik ist nach wie vor der direkte Erregernachweis mittels bakteriologischer Untersuchungsmethoden. Das gilt ebenso für die Wiederfindung der Salmonellen-Impfstämme. Diese exprimieren als Ausdruck der Attenuierung Resistenzmarker, die eine zuverlässige Unterscheidung mit den Salmonellen-Feldstämmen erlauben.

Die TAD Salmonella vac[®] E und TAD Salmonella vac[®] T Impfstämme wachsen infolge der als Stoffwechseldrift entstandenen Resistenz auf Nährböden mit Streptomycin und Rifampicin bzw. Nalidixinsäure und Rifampicin. Außerdem wachsen infolge der mit einer erhöhten Permeabilität einhergehenden Zellmembranmutation die Impfstämme im Unterschied zu den Feldstämmen nicht auf Nährböden, die mit Erythromycin angereichert sind (antiepidemischer Marker).

Diese Mutation ist ursächlich auch dafür verantwortlich, dass diese Impfstämme nicht auf allen in der bakteriologischen Diagnostik gebräuchlichen Anreicherungs- und Selektivmedien anzüchtbar sind. Für den zuverlässigen Impfstamm-Nachweis im bakteriologischen Labor bietet sich nach Erfahrung von LAH folgende Methode an: Anreicherung in Peptonwasser und auf Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Agar mit Zusatz von 5 µg/ml Nalidixinsäure und 100 µg/ml Rifampicin für TAD Salmonella vac[®] T bzw. 200 µg/ml Streptomycin für TAD Salmonella vac[®] E austreichen. Die Probenentnahme muss zeitnah zur Impfung erfolgen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass sich der Lebendimpfstoff zunächst *in vivo* vermehrt und nach vorübergehender Persistenz im Tier kurzfristig in die Umwelt ausgeschieden wird. Somit variieren die von LAH empfohlenen Untersuchungszeitpunkte in Abhängigkeit von dem Probenmaterial: Kloakentupfer, Sockentupfer und Sammelkotproben (zwei bis fünf Tage nach Impfung), Leber und Milz (vier bis fünf Tage nach Impfung), Blinddarm mit Inhalt (sieben Tage nach Impfung).

Nach Anzüchtung der salmonellenverdächtigen Kolonien erfolgt die biochemische Bestätigung des Befundes mittels API 20E (BioMerieux). Die obligatorische Serotypisierung wird mittels definierter und standardisierter Salmonella-Antiseren durchgeführt. Die Serovar *S. Enteritidis* wird mittels Antiserum gegen O:9 und H:gm bestätigt. *S. Typhimurium* agglutiniert mit den Antiseren O:4,5 und H:i. Nach Bestätigung des Salmonellen-Isolates wird die Identifizierung des Impfstammes mit der Mikrodilutionsmethode unter Verwendung der AviPro[®] Plate (LAH) durchgeführt. Diese Platte verfügt über 96 Vertiefungen, die mit unterschiedlichen Antibiotika in variierenden Konzentrationen beschichtet sind. Für die Impfstammerkennung werden die Resistenzmarker Rifampicin und Streptomycin in definierten Konzentrationen verwendet. Zusätzlich wird die Empfindlichkeit der Impfstämme gegenüber geeigneten Konzentrationen von Erythromycin gemessen (REBESKI und SCHEDLETZKY, 2003). Im Gegensatz zum direkten Erregernachweis ermöglichen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von salmonellenspezifischen Antikörpern einen indirekten Erregernachweis. Hier ist zu bedenken, dass im Falle eines positiven Ergebnisses keine Aussage über eine bestehende oder zurückliegende Infektion mit Salmonellen gemacht werden kann. Es bleibt somit lediglich ein begründeter Verdacht einer Salmonelleninfektion. Erschwerend ist die Tatsache, dass nach oraler Applikation von Salmonella-Lebendimpfstoffen nur kurzzeitig zirkulierende Antikörper mittels der kommerziell verfügbaren enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Systeme detektiert werden. Diese Tatsache hat in der Praxis dazu geführt, dass die ELISA-Methode bevorzugt im Rahmen der Herdenbestandsuntersuchung und nicht für die Einzeltierdiagnostik eingesetzt wird. Der Nachweis messbarer IgA-Spiegel als Ausdruck der primär induzierten lokalen Schleimhaut-assoziierten Immunantwort spiegelt sich in dem Bemühen von ELISA-Herstellern wieder, isotypspezifische (IgM, IgA, IgY) ELISA-Systeme zu entwickeln. Diese Systeme werden bereits routinemäßig zum differenzierten Nachweis von Antikörpern im Schwein verwendet (LDL, 2002) und derzeit für das Huhn entwickelt und evaluiert (LEHMANN, 2003). Die Unterscheidung der Impfstämme mittels molekularbiologischer Methoden wie z.B. der Polymerase-Ketten-Reaktion ist bisher in der Praxis nicht etabliert.

Schlussbetrachtung

Für die Bekämpfung und Kontrolle von Infektionen mit *S.E.* und *S.Tm.* in Geflügelbeständen stehen dem Geflügel-tierarzt mit TAD Salmonella vac[®] E und TAD Salmonella vac[®] T Lebendimpfstoffe zur Verfügung, die unter Praxisbedingungen erfolgreich eingesetzt werden. In Ergänzung zu dem Impfschutz lassen sich die Impfstämme mittels diagnostischer Maßnahmen eindeutig von Feldsalmonellen unterscheiden. Auch bei konsequenter Einhaltung der hier aufgeführten Parameter ist aber jeder Impferfolg nur in einem engen Zusammenhang mit der Optimierung der Haltungsbedingungen und der Einhaltung aller hygienischen Voraussetzungen zu sehen. Weiterhin lässt sich die Gesamtbelastung eines Hühnerbestandes mit Salmonellen nur durch die lückenlose längerfristige und flächendeckende Impfung der Herden senken, was zu einer Minimierung des Eintrages von Salmonellen in Lebensmittel tierischen Ursprungs führt.

Literatur

- BARROW, P.A., J.O. HASSAN, A. BECHERIE (1990): Reduction in faecal excretion of *salmonella* typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S.typhimurium* vaccines. *Epid. Inf.* 104, 413-426
- BARROW, P.A., Magarethe LOVELL, A. BECHERIE (1991): The use of two live vaccinated vaccines to immunise egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Pathology* 20, 681-692
- BEER, J. (1991): Impfversuche mit potentiellen *Salmonella* Typhimurium Impfstoffkandidaten. VII. Internationaler Kongress für Tierhygiene, Proceedings 1026-1030
- BEHR, K., M. PÖPPEL, G. REETZ (2003): Jahrbuch der Geflügelwirtschaft, 151
- COOPER, G.L. (1994): Salmonellosis-infections in man and chicken: pathogenesis and the development of live vaccines - a review. *Vet. Bulletin* 64, 123-143
- COOPER, G.L., L.M. VENABLES, M.J. WOODWARD et al. (1994): Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis aroA* live oral vaccine candidate. *Infect. Immun.* 62, 4747-4754
- FEHLHABER, K. (2001): Schwierigkeiten und Defizite in der Bekämpfung lebensmittelbedingter Salmonellosen. *Fleischwirtschaft* 11, 108-109
- GERMANIER, R., E. FURER (1975): Isolation and characterisation of gale mutant Ty21a of a *Salmonella typhi*: a candidate for live, oral typhoid vaccine. *J. Inf. Diseases* 131,553-558
- GÜRTLER, M. (2002): *In-vitro* und *in-vivo*-Studien zur Wirksamkeit von Eigelbantikörpern gegen *Salmonella* Enteritidis. Dissertation, Universität Leipzig
- HAHN, Ilka (1999): Ein Beitrag für den Verbraucherschutz: TAD Salmonella vac[®] E - ein neuer Lebendimpfstoff für Hühner gegen *Salmonella* Enteritidis. *Lohmann Information* 3/99, 17-20
- HARTUNG, M. (2002): Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2002. Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin

- HASSAN, J.O., R. CURTISS (1997): Efficacy of a live avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens to *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. Avian Disease 41, 783-791
- IBURG, M. (2003): Technische Hinweise zur Trinkwasserapplikation von Salmonella-Lebendimpfstoffen bei Geflügel. Lohmann Information 1/2003, 1-5
- IBURG, M. (2003): Drinking water vaccination against Salmonella - a proven concept in day old chicks. Lohmann Information, 28, 23-27
- LINDE, K., Ilka HAHN, E. VIELITZ (1996): Entwicklung von optimal für das Huhn attenuierte Salmonella-Lebendimpfstoffe. Tierärztliche Umschau 51, 23-31
- MARTIN, G., Ingrid HÄNEL, R. HELMUT et al. (1996): Untersuchungen zur Immunisierung mit geeigneten *Salmonella* Enteritidis-Mutanten-1. Herstellung und *in-vitro*-Charakterisierung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 109, 325-329
- METHNER, U. (1991): Erarbeitung eines Modells zur experimentellen oralen Infektion des Geflügels mit epidemiologisch bedeutsamen Salmonella-Serovaren. Dissertation, Universität Leipzig
- METHNER, U. (2003): Zum Vorkommen von Salmonellen bei Legehennen in unterschiedlichen Haltungsformen. 22. Jenaer Symposium Zoonosen des Geflügels
- REBESKI, D.E., H. SCHEDLETZKY (2003): Microdilution method used for antibacterial susceptibility testing in poultry. LAH vaccine forum 2003, Utrecht
- SUPHABPHANT, M.D., M.D. YORK, B.S. POMEROY (1982): Use of two vaccines (live G30D or killed RW 16) in prevention of *Salmonella typhimurium* infections in chickens. Avian Disease 27, 602-615

Anschrift der Verfasser

Dr. Ilka Schröder
Abschnede 64
27472 Cuxhaven

E-Mail: ilka.schroeder@lah.de

Dr. Michael Iburg
Dr. Dr. Dierk E. Rebeski
Heinz-Lohmann-Straße 4
27472 Cuxhaven

E-mail: michael.iburg@lah.de
dierk.rebeski@lah.de